科学通报 2008 年 第 53 卷 第 21 期: 2604 ~ 2611
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

大豆转录因子 GmWRKY57B 的基因克隆及功能分析

张兰[①*], 王晓萍[②*], 毕影东[②], 张春义[①], 范云六[①], 王磊[①†]

① 中国农业科学院生物技术研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081
② 哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150025
* 同等贡献
† 联系人, E- mail: wanglei@caas.net.cn

2008-06-17 收稿, 2008-08-20 接受
国家重点基础研究发展计划(批准号: 2004CB7200)和黑龙江省教育厅项目(批准号: 10541088)资助

摘要 WRKY 类转录调控因子在高等植物中构成一个基因超家族, 它不但广泛参与了植物对非生物胁迫和生物胁迫的反应, 还参与了生长发育及多种代谢途径的调控. 本研究构建了一个大豆 cDNA 文库, 采用酵母单杂交的方法, 用来自 *AtNPR1* 启动子区的 W-box 对构建的大豆 cDNA 文库进行筛选, 获得了 *GmWRKY57B* 基因, 该基因全长 1033 bp, 编码 299 个氨基酸, 属于 WRKY 类转录因子的第III组; 酵母挽救实验及凝胶阻滞实验均表明, GmWRKY57B 能够与 W-box 特异性结合; 酵母体内的转录激活实验表明, GmWRKY57B 在酵母细胞中具有转录激活功能; *GmWRKY57B* 在大豆根、茎、叶中均有表达; *GmWRKY57B* 基因在烟草中的过表达能够提高转基因烟草植株的抗旱性, 表明 *GmWRKY57B* 基因在非生物逆境中有一定的功能.

关键词
大豆
WRKY
转录因子
W-box
转基因
抗旱性

WRKY类转录因子是一类含有保守的WRKY等氨基酸的锌指蛋白. 一直以来, WRKY类转录因子被认为是植物所特有的类型[1]. 最近, 在非光合生物黏菌-盘基网柄菌和绿藻中发现了编码类似WRKY的蛋白[2]. WRKY蛋白结构的共同特点是各成员中都含有1~2 个WRKY结构域. 该结构域包含大约 60 位氨基酸残基, N端的 7 肽WRKYGQK十分保守, C端有一个C_2H_2或C_2HC的锌指纹结构. 根据WRKY结构域的数目和锌指纹结构的类型, WRKY蛋白可分成 3 组[1]: 第 I 组含 2 个WRKY结构域, 锌指纹结构模式为C-X_{4-5}-C- X_{22-23}H-X-H, 如SPF1[3], ABF1[4], PcWRKY1[5]和AtWRKY33[6]等; 第 II 和III组均含 1 个WRKY结构域, 第 II 组锌指纹结构模式与第 I 组相同, 如AtWRKY18 (NP_567882)等; 第III组仅在组成锌指纹的氨基酸有变化, 为 C-X_7-C-X_{22-23}-H-X-C, 如AtWRKY70 (NP_191199)等.

WRKY 转录因子能与核心序列为(T)(T)TGAC(C/T)的 W-box 顺式元件特异结合, 该序列是WRKY 蛋白与 W-box 元件的结合是必需的. TGAC 核心序列作为激发子反应元件, 最初在欧芹*PRl-1* 启动子中被鉴定[7]. 随后, 该元件在许多其他的防卫相关基因或伤害应答基因, 如受激发子诱导的玉米*PRms*[8]、拟南芥中的受体类蛋白激酶(receptor-like protein kinase, RLK)基因[9]、*NPR1*[10]等的启动子区域相继发现. 采用cDNA芯片方法, 对 14 种不同的系统获得抗性(SAR)诱导或抑制条件下拟南芥中基因表达的变化进行了检测, 结果表明, 包括*PR-1* 在内的一组基因(26 个)可被病原等条件诱导. 所有这些基因的1.1 kb启动子区域平均含有 4.3 个W-box, 很少含有两个以下的W-box[11]. 不仅如此, 拥有TGAC核心序列的W-box还存在于发育、代谢相关基因和*WRKY*基因本身的启动子区域中, 如受AtWRKY6 调控的拟南芥受体样激酶SIRK基因上游 1.1 kb的启动子区域含有 9 个W-box[12]. 这些数据提示*WRKY*基因广泛参与植物的防卫反应和发育、代谢等生理过程, 并具有自我调控的功能.

NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related protein1)是由各类已知抗病信号传导途径组成的信号传

导网络中的关键交叉点，参与各种类型的抗病性调控. 它首先在拟南芥中得到克隆[13,14]，在多种重要经济作物中存在其同源基因，已在烟草和番茄中分离到其cDNA序列[15]. Yu等人[10]研究证明，一些WRKY转录因子(如AtWKRYl8等)可与*NPR1*基因启动子区域的W-box序列相结合，正向调节*NPR1*表达，从而激活下游因子，增强 *PR* 基因的表达，提高植物的抗病性. 若将W-box序列突变，使其不能与WRKY识别、结合，则导致启动子不能激活下游防卫基因的表达，从而无法表现抗性.

为了提高大豆的抗逆性，分离可以调控 *NPR1* 的WRKY 类转录因子，本研究通过酵母单杂交的方法，从大豆 cDNA 文库中分离了转录因子基因 *GmWRKY57B*，并对其功能进行了初步分析，结果表明，GmWRKY57B 是一个在大豆根茎叶中均有表达的、能与 *AtNPR1* 基因上游 W-box 相互作用的具有转录激活功能的WRKY类转录因子，*GmWRKY57B*基因在烟草中的过表达可以提高烟草植株的抗旱性.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料. 大肠杆菌*E. coli* Rosetta，酵母菌株yWAM2 (Leu$^-$, His$^-$, Trp$^-$)，农杆菌菌株LBA4404，载体pRS315-His (Leu$^+$)，pET30a，YepGAP (Trp$^+$)，pPZP212-35S (本实验室改造)，烟草NC89，大豆品种中黄 20 号均为本实验室保存.

(ⅱ) 大豆根 cDNA 文库的构建与扩增. 按GibcoBRL公司的SuperScript^{TM} Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning Kit说明书进行. 取 5 mg大豆根mRNA构建cDNA文库，库容量为 5.2×10^6 cfu，文库载体为pPC86 (Trp$^+$)，具体参见Wang等人[16]的方法.

(ⅲ) 大豆cDNA文库的筛选. 所有酵母转化均参照TRAFO的方法，所用酵母菌株为yWAM2 (Leu$^-$/His$^-$/Trp$^-$)[17]. 根据拟南芥*NPR1* 基因启动子区序列设计合成W-box序列(3×W-box(+)，5′-CTAGAGT**TGACTTGAC**TTGGT**TGACTTGAC**TTGGT**TGACTTGAC**TTG-3′; 3×W-box (–): 5′-GATCCAAGTCAAGTCAACCAAGTCAAGTCAACCAAGTCAAGTCAACT-3′)，然后将两条链退火、T$_4$ PNK磷酸化后连接到pRS315- His (Leu$^+$)载体上(*Xba* Ⅰ和*Bam*H Ⅰ酶切)，获得诱饵载体pRSWbox (Leu$^+$)质粒. 同样的方法，合成3×mW-box(+) (5′-CTAGAGT**cagCTcagC**TTGGT**cagCTcagC**TTG-3′) 和 3×mW-box (–) (5′-GATCCAAGCTGAGCTGACCAAGCTGAGCTGACCAAGCTGAGCTGACT-3′)后获得挽救载体pRSmWbox (Leu$^+$)质粒.

(ⅳ) 凝胶阻滞实验(EMSA). 将 *GmWRKY57B* 经 *Sal* Ⅰ酶切、Klenow 补平，再经 *Not* Ⅰ酶切后连接到具有 His-tag 序列的原核表达载体 pET30a (*Eco*RⅤ+*Not* Ⅰ酶切)上，得到 His-*GmWRKY57B*. 将其转入 *E. coli* Rosetta 菌株中，28℃, 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导表达蛋白. His-GmWRKY57B 融合蛋白利用 AKTA 蛋白纯化系统(Amersham)进行纯化.

分别合成野生型的W-box和突变的mW-box序列(W-box (+), 5′-TCGTTGACTTGACTTGGCTC-3′; W-box (–), 5′-GAGCCAAGTCAAGTCAACGA-3′; mW-box1 (+), 5′-TCGT***cag***CT***cag***CTTGGCTC-3′; mW-box1 (–), 5′-GAGCCAAGCTGAGCTGACGA-3′; mW-box2 (+), 5′-TCGTTGA***a***TTGA***a***TTGGCTC-3′; mW-box2 (–), 5′-GAGCCAATTCAATTCAACGA-3′)，退火获得W-box，mW-box1 和mW-box2 元件. 用γ-^{32}P-ATP 标记上述元件，并进行结合反应，聚丙烯酰胺凝胶电泳分析检测，具体方法参见Wang等人[18]的方法.

(ⅴ) 酵母细胞中转录激活分析. GmWRKY57B用*Sal* Ⅰ酶切、Klenow补平，再经*Not* Ⅰ酶切后，连接至酵母表达载体YepGAP(Trp$^+$)(*Ecl*136 Ⅱ+*Not* Ⅰ酶切)上，得到YepGmWRKY57B(Trp$^+$)；将YepGmWRKY57B和 pRSWbox同时转化酵母，分别在缺陷培养基(Leu$^-$/Trp$^-$)和(Leu$^-$/Trp$^-$/His$^-$)上进行培养，分析其生长状况.

(ⅵ) *GmWRKY57B* 基因在大豆体内的表达特异性分析. 总 RNA 提取按照 RNAgents Total RNA Isolation System (Promega)进行. 取 2 μg 总 RNA 进行反转录，反转录参照试剂盒说明书进行(SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen). 根据大豆actin 基因(V00450)合成内标引物 GmAcfw (5′-TGATGGTGTGAGTCACACTGTACC-3′)和 GmAcrv (5′-GGACAATGGATGGGCCAGACTC-3′) (扩增产物大小644 bp). PCR 反应条件为: 94℃预变性 2 min; 94℃ 20 s, 53℃ 20 s, 72℃ 40 s, 25 个循环; 72℃延伸 10 min. 根据 *GmWRKY57B* 基因序列合成引物GmWRKY57B FW (5′-CGGAATTCACC ATGGCAAAACTTGGTTGT-3′)和 GmWRKY57B RV (5′-GCCGTCATCAATTGGAGCTT-3′) (扩增产物大小 400 bp). PCR 反应条件为: 94℃预变性 2 min; 94℃ 20 s, 53℃ 20 s, 72℃ 20 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min.

(vii) *GmWRKY57B*基因的烟草转化及抗旱性分析. *GmWRKY57B*经*Sal* I 酶切、Klenow补平, 再用*Sac* I 酶切后连接至植物表达载体pPZP212-35S (*Xba* I 酶切, Klenow补平, *Sac* I 酶切)上, 得到212GmWRKY57B; 将212GmWRKY57B转入农杆菌菌株LBA4404, 用叶盘法转化烟草NC89[19], 在含有150 mg/L卡那霉素的培养基上筛选, 得到具有抗性的转基因烟草植株.

取转基因烟草叶片约 100 mg, 用SDS方法提取DNA进行PCR检测. 载体上的NOS引物为5′-TATGATAATCATCGCAAGACC-3′; GmWRKY57B基因上的引物FW3为5′-ACCATGGCAAAACTTGGTTGT-3′. PCR反应条件为: 94℃预变性 2 min; 94℃ 20 s, 53℃ 20 s, 72℃ 20 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min. 将PCR阳性植株移栽至温室, 收获T_1代种子.

取转基因烟草叶片约 1 g, 提取总RNA (方法同上). 以GmWRKY57B基因为模板, 以FW2 (5′-AACATTCCTAGATTGGAATATG-3′)和RV2 (5′-GCCGTCATCAATTGGAGCT-3′)为引物进行PCR扩增, 反应条件为: 94℃预变性 2 min; 94℃ 20 s, 53℃ 20 s, 72℃ 20 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 获得394 bp的*GmWRKY57B*基因片段, 该片段用α-^{32}P-dCTP标记后作为探针进行Northern blot分析, 标记方法参照Primer-a-gene labeling system (Promega)进行. Northern blot在Church缓冲液 (0.5 mol/L Na_2HPO_4, pH 7.2, 1 mmol/L EDTA, 7% SDS, 1% BSA)中65℃杂交过夜, 65℃下洗膜(2×SSC, 0.1% SDS 2 次; 1×SSC, 0.1% SDS 2 次), 放射自显影.

对转基因烟草T_1植株进行抗旱性分析: 先将转基因T_1代种子在含有卡那霉素的培养基上筛选, 待植株生长至具两片真叶时移栽至温室培养, 培养条件为: 营养土∶蛭石为 2∶1, 光周期 16 h光照/8 h黑暗, 白天/晚上温度为 23℃/27℃, 相对湿度 20%~30%, 每个株系移栽 6 盆, 每盆 4 株, NC89 为对照; 正常生长至出现第 4 片真叶时, 停止给水, 直至大部分野生型植株失水死亡时复水, 复水 3 d后统计存活率, 并用*t*检验做统计分析.

2 结果与分析

2.1 大豆中 W-box 结合因子 GmWRKY57B 的分离及其序列分析

为了分离大豆中的WRKY类转录因子, 我们首先构建了大豆根的cDNA文库, 该文库含有 5.2×10^6 个克隆, 插入频率为 90%, 插入基因的片段大小平均为 1.2 kb. 根据拟南芥*NPR1*基因启动子区的W-box序列设计合成了 3×W-box序列, 并将其克隆至pRS315His(Leu^+)载体, 作为酵母单杂交系统的诱饵筛选所构建的大豆cDNA文库(图 1(a)). 从约 2×10^6 个酵母转化子中获得了 11 个阳性克隆, 均能在筛选培养基(His^-/Trp^-/Leu^-)上正常生长, 测序表明, 其中 3 个克隆具有相同的核苷酸序列(1033 bp), 编码一个 299 个氨基酸的可读框; Blast分析发现, 与*GmWRKY57* (EU375353)[20]相比, 其mRNA序列3′UTR区少 110 bp; 而氨基酸序列与WRKY57 (ABY84661)序列则完全一致, 因此命名该基因为*GmWRKY57B*.

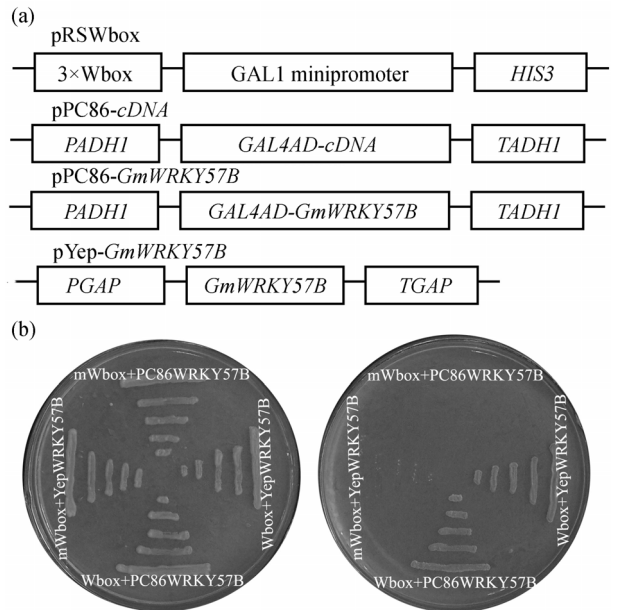


图 1 载体构建及 GmWRKY57B 在酵母细胞内激活 *HIS3* 的表达

(a) 诱饵载体pRSWbox, cDNA文库构建, PC86-*GmWRKY57B*载体及酵母表达载体Yep-*GmWRKY57B*的构建示意图; (b) 酵母转化子在筛选培养基Trp^-/Leu^- (左)和筛选培养基Trp^-/Leu^-/His^- (右)上的生长情况. PC86-GmWRKY57B或Yep-GmWRKY57B分别与pRSWbox和pRSmWbox转化酵母, 只有含有PC86-GmWRKY57B和W-box序列或Yep-GmWRKY57B和W-box序列的酵母才能在筛选培养基Trp^-/Leu^-/His^-上正常生长

序列分析表明, GmWRKY57B含有 1 个保守的WRKY结构域, 其锌指结构模式为C-X_7-C-X_{23}-H-X-C, 属于WRKY家族的第III组. GmWRKY57B与来

源于不同物种的 WRKY 家族第III组的蛋白相比较, 其保守性主要体现在 WRKY 结构域和推测的核定位信号区(图 2); 其中相似性最高的是来自 *Solanum tuberosum* 的 StWRKY6, 但其相似性也只有 23.2%. GmWRKY57B 与拟南芥 WRKY 家族中相似性最高的是 WRKY70, 但相似性仅有 14.9%. 从系统进化树来看(图 3), 虽然 16 个 WRKY 蛋白均属于 WRKY 家族第III组, 但它们之间的序列同源性均不高, 说明 WRKY 类转录因子在进化上的多样性, 也预示了其功能的多样性.

2.2 GmWRKY57B 与 W-box 的结合特异性分析

为了确定GmWRKY57B与W-box结合的特异性, 我们对 3×W-box的序列进行了突变, 合成了突变的3×mW-box序列, 并克隆至pRS315 His (Leu$^+$)载体. 将pPC86-GmWRKY57B分别与pRSWbox和

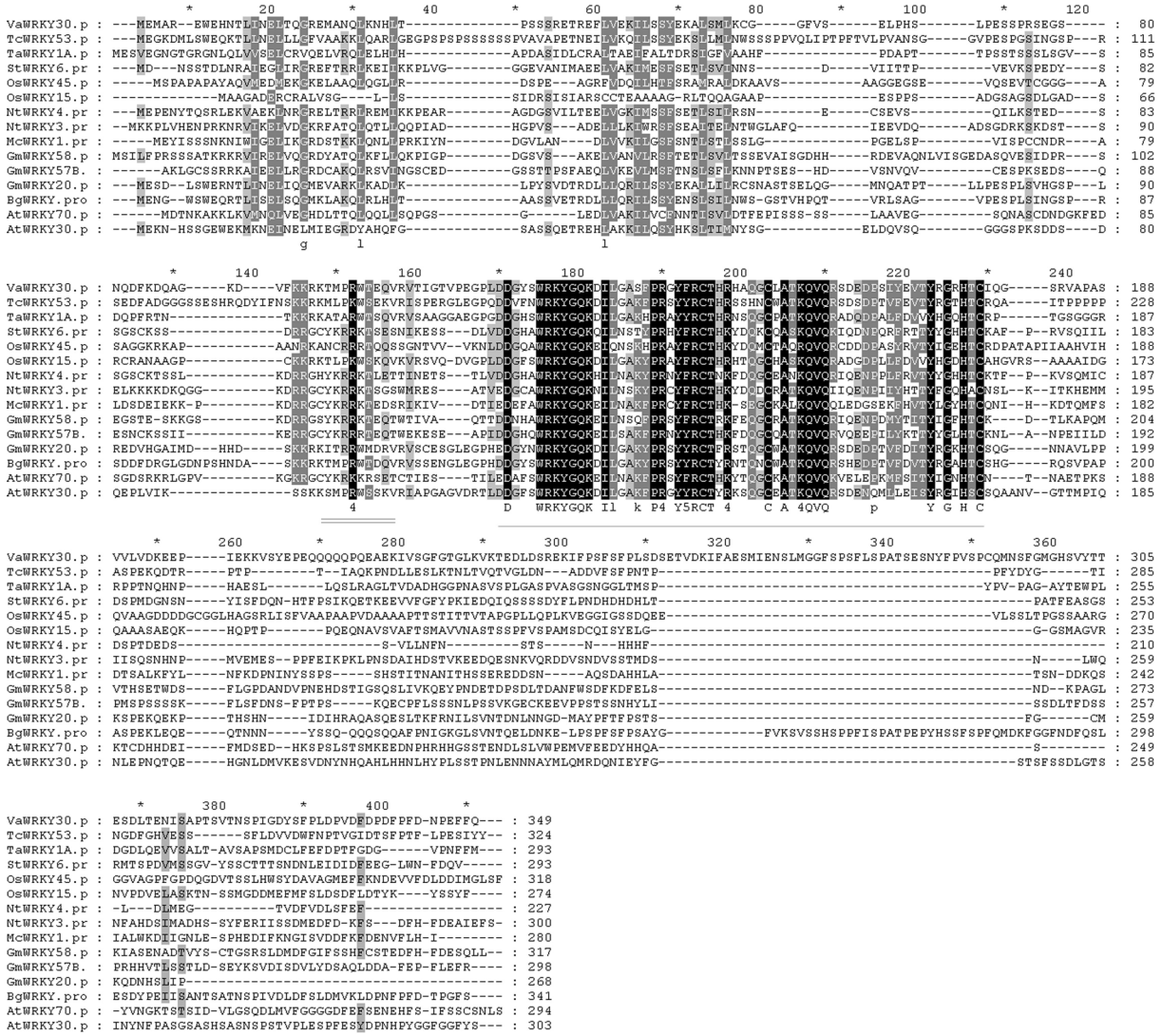


图 2 GmWRKY57B 与不同物种中 WRKY 蛋白序列比较

序列比对用 Clustal W 程序(http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)进行; 保守结构域的分析使用 GeneDoc 程序. 黑色阴影表示 15 个序列中均保守的序列, 其他根据保守程度的高低依次使用深灰色和浅灰色阴影标示; 一致的序列分别在下面列出. 数字 4, 5 表示不同种类的氨基酸: 4, KR (碱性氨基酸); 5, FY (芳香族氨基酸). WRKY 结构域用下画线标示; 核定位信号区(NLS)用双下画线标示. 用于比对的 WRKY 蛋白的氨基酸序列在 GenBank 的登录号为: StWRKY6 (ABU49725), NtWRKY4 (AAF61864), VaWRKY30 (AAR92477), GmWRKY58 (ABY84662), NtWRKY3 (AAF61863), AtWRKY70(NP_191199), McWRKY1(BAA87069), BgWRKY (BAG15875), AtWRKY30 (NP_568439), OsWRKY45(DAA05110), OsWRKY15(NP_001043755), GmWRKY20(ABS18424), TaWRKY1A(ABC65846), TcWRKY53 (ABN79278)

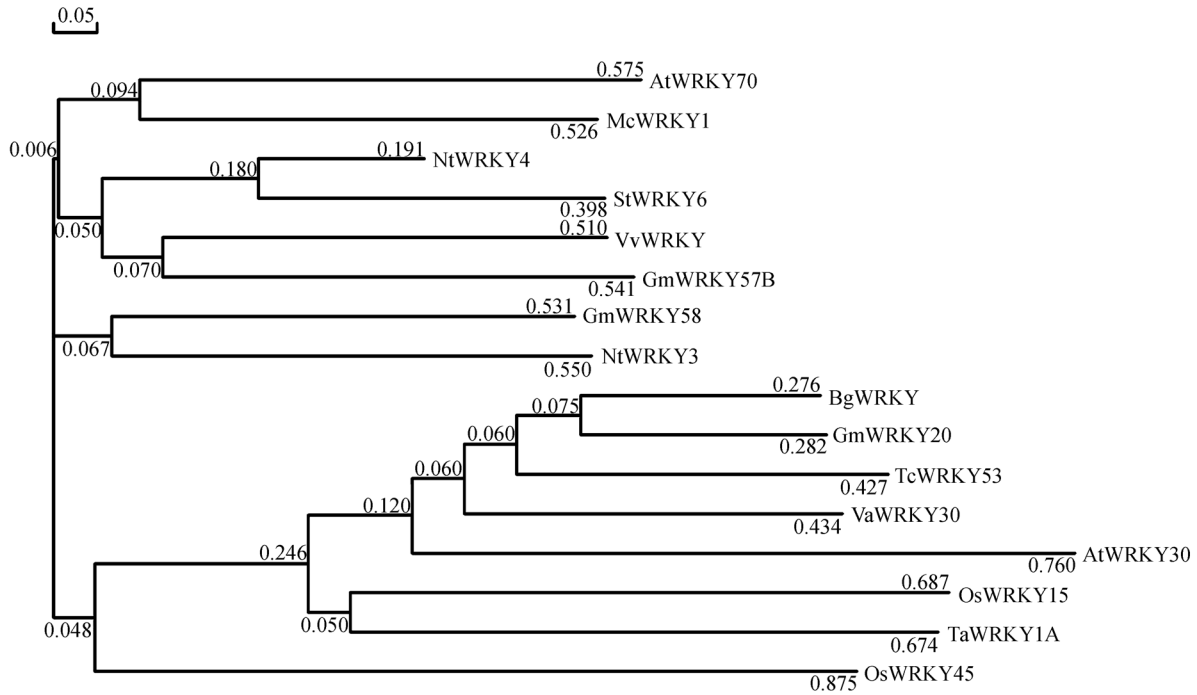


图 3 GmWRKY57B 蛋白的系统进化分析

利用 DNAMAN 程序分析，图中数值表示了分支的长度，表明了 WRKY 蛋白之间进化上的关系

pRSmWbox共转化酵母，结果表明，只有同时含有GmWRKY57B和W-box的酵母在筛选型培养基($His^-/Trp^-/Leu^-$)上能生长，而同时含有GmWRKY57B和mWbox的酵母在筛选型培养基($His^-/Trp^-/Leu^-$)上不能生长，表明GmWRKY57B在酵母体内能够激活报告基因*HIS3* 的表达，GmWRKY57B基因在酵母体内能够与W-box特异的结合(图 1(b)).

为了验证GmWRKY57B在体外是否仍具有W-box结合特异性，我们将GmWRKY57B构建到原核表达载体pET30a上，得到的His-GmWRKY57B在IPTG诱导下产生出了一条约 38 kD的蛋白条带，采用亲和层析法纯化出GmWRKY57B蛋白用于凝胶阻滞实验．用 γ-^{32}P 标记的 W-box*，mW-box1*，mW-box2*与GmWRKY57B蛋白在体外混合进行结合反应，非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后(图 4(a))可以清楚地看到泳动速度较慢的W-box*探针条带，说明W-box能够与His-GmWRKY57B蛋白结合．而在同样的条件下mW-box1*，mW-box2*探针则未见阻滞的条带，说明mW-box不能够与His-GmWRKY57B蛋白结合．His-tag蛋白与W-box*，mW-box1*和mW-box2*探针的相互作用均没有出现被阻滞的条带，说明His-tag蛋白与W-box，mW-box均没有结合作用，不影响GmWRKY57B与W-box的结合特异性．上述结果表明，GmWRKY57B在体外具有W-box结合特异性．W-box核心序列中的“**TGA**C”突变为“**cag**C”或者将“TGA**C**”突变为“TGA**a**”，结果均导致GmWRKY57B蛋白不能与之结合，说明核心序列中TGAC的一个碱基突变就会导致其与蛋白质的结合活性完全丧失．

为了进一步验证GmWRKY57B蛋白与W-box的结合是特异性的，我们进行了竞争性结合实验．在结合反应体系中加入没有标记的W-box，它能够与标记的W-box (W-box*)竞争性地与His-GmWRKY57B蛋白结合，使标记的条带减弱甚至消失．在结合反应体系中分别加入了 20 和 100 倍的未标记的 W-box 后电泳(图 4(b))，结果表明，加入了未标记的 W-box 后，标记的探针与 GmWRKY57B 蛋白的结合量显著降低，验证了 GmWRKY57B 蛋白与 W-box 元件的结合特异性，而其中的一些非特异性结合条带则没有变化(图 4(b)).

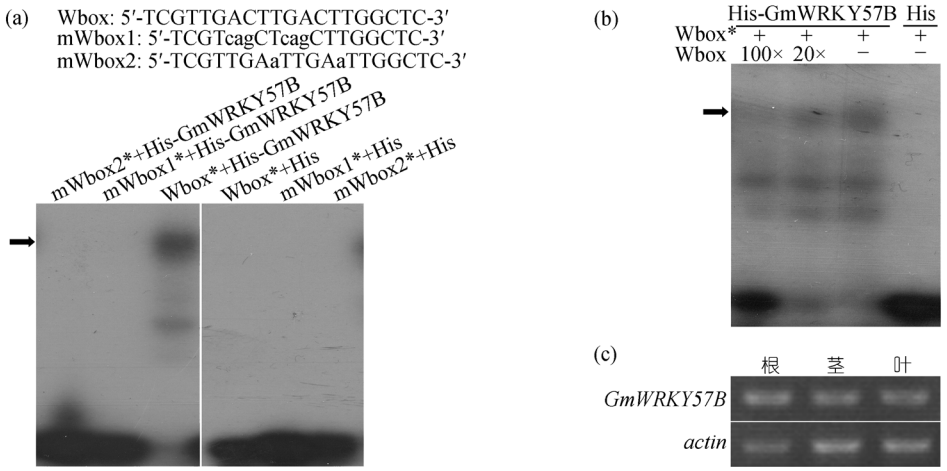


图 4　GmWRKY57B 蛋白与 W-box 的结合特异性分析以及 *GmWRKY57B* 基因在大豆体内的表达分析

(a) GmWRKY57B 与 W-box 的结合活性分析. 经同位素标记的元件分别标为 Wbox*, mWbox1*, mWbox2*; 箭头所指为 His-GmWRKY57B 与 Wbox*结合后的滞后条带. (b) His-GmWRKY57B 蛋白与 W-box*竞争性结合实验. 20×, 100×分别表示未标记的竞争探针的量是标记探针 20 倍和 100 倍. “+”, “–”分别表示反应体系中加入或不加该成分. 箭头所指为 His-GmWRKY57B 与 Wbox*特异结合后的滞后条带; (c) *GmWRKY57B* 在大豆根、茎、叶中的表达(RT-PCR)分析

2.3　GmWRKY57B 转录激活功能分析及 GmWRKY 在大豆体内的表达分析

序列分析发现, GmWRKY57B 具有保守的 WRKY 结构域, 而且具有核定位信号, 表明 GmWRKY57B 属于 WRKY 类转录因子. 一般来说, 转录因子除了具有与 DNA 的结合特异性之外, 还具有转录激活功能. 为了验证 GmWRKY57B 是否具有转录激活功能, 我们将 *GmWRKY57B* 构建在 YepGAP 载体上, 得到 YepGmWRKY57B, 形成非融合的GmWRKY57B蛋白(图 1(a)). YepGmWRKY57B和pRSWbox同时转化酵母后能在筛选培养基($His^-/Trp^-/Leu^-$)上正常生长, 表明 GmWRKY57B能与W-box结合并激活下游报告基因 *HIS3* 的表达, 说明GmWRKY57B既有DNA结合功能, 也有转录激活功能(图 1(b)).

为了分析 GmWRKY57B 在大豆体内的表达特性, 对获得的 *GmWRKY57B* 基因在大豆体内的表达进行分析. 结果表明 *GmWRKY57B* 基因在大豆根、茎、叶中均有表达, 其表达量基本一致(图 4(c)), 推测 *GmWRKY57B* 在大豆根、茎、叶内的表达无组织器官特异性.

2.4　转 *GmWRKY57B* 基因烟草的获得及抗旱性分析

为了分析*GmWRKY57B*的生物学功能, 我们将其构建到植物表达载体上, 在 35S启动子的驱动下进行过表达. 共获得转基因烟草抗性植株 24 株, 其中PCR阳性植株 17 株, 将其移栽至温室培养, 收获T_1种子. 为了分析GmWRKY57B在转基因烟草植株中的表达情况, 我们采用GmWRKY57B基因 5′端的 394 bp序列作为探针进行Northern blot分析, 17 株PCR阳性转基因植株中有 12 株均杂交出明显的条带(数据未显示), 但不同转基因株系之间杂交信号有强弱之分, 可能是由于插入位点不同而造成了其表达量的差异.

选取表达量不同的转 *GmWRKY57B* 基因烟草株系 57B-1, 57B-2, 57B-3 和野生型进行抗旱性分析(图 5(a)). 停止给水 23 d 后, 大部分野生型植株已经失水死亡, 复水 3 d 后统计存活率, 其中野生型对照有 17%的植株存活; 转基因株系 57B-1 的存活率和对照相近, 为 21%; 而另两个转基因株系则表现了相对较高的存活率: 57B-2, 50%; 57B-3, 71% (图 5(b)和(c)), 这些结果表明了转 GmWRKY57B 基因后, 烟草植株的抗旱性得到了提高.

3　讨论

植物中的WRKY蛋白被证实能与拥有核心序列TGAC的W-box元件结合[5]. Yu等人[10]选择拟南芥 *NPR1* 启动子区的W-box序列做探针, 拟南芥WRKY18蛋白能与其结合, 而将其核心序列TGA**C**突变为TGA***a***则二者不再能结合. Wang等人[21]选择

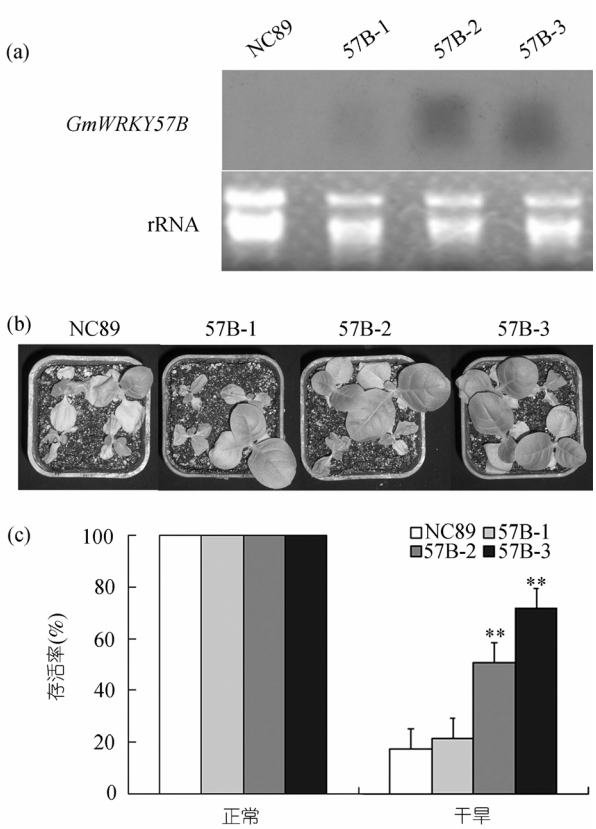


图 5 转 *GmWRKY57B* 基因烟草植株 Northern blot 以及抗旱性分析

(a) 转 *GmWRKY57B* 基因植株的 Northern blot 分析. (b) 转 *GmWRKY57B* 基因烟草植株旱处理 23 d, 复水 3 d 后的生长情况. (c) 干旱处理后转基因植株的存活率分析. 每个数据都是 3 次实验的平均值, 每次实验有 24 株植株. **, 转基因植株与野生型植株存活率比较达到了极显著水平(P<0.01)

水稻 *PR1-1a* 基因启动子区的的 W-box 序列作为探针, 水稻 OsWRKY89 蛋白能与其结合, 而将其核心序列 TGAC 突变为 TCTC 则二者不再能结合. 本研究根据拟南芥 *NPR1* 启动子区的 W-box 序列设计了一段序列, GmWRKY57B 蛋白能与其结合, 将其核心序列除了由 TGAC 突变为 TGAA 外, 或者将其突变为 CAGC 后, GmWRKY57B 蛋白均不再能与其结合, 说明了 W-box 核心序列 TGAC 其中一个碱基的突变就会导致其结合功能的完全丧失, 说明了其在 WRKY 类转录因子调控过程中的重要性.

Zhou等人[20]对大豆中 64 个WRKY类转录因子进行了研究, 其中 *GmWRKY13* 可能参与侧根的发育, 还增加了植株对盐和甘露醇的敏感性; *GmWRKY21* 提高了植株的抗寒性; *GmWRKY54* 提高了植株的抗盐性和抗旱性. 本研究中的 *GmWRKY57B* 提高了烟草植株的抗旱性, 表明 WRKY 类转录因子在植物抗寒、旱、盐等非生物逆境中具有一定的功能.

GmWRKY57B 含有 1 个保守的 WRKY 结构域, 其锌指结构模式为C-X_7-C-X_{23}-H-X-C, 属于WRKY蛋白第III组. 目前拟南芥 WRKY 家族第III组成员中研究较多的是 WRKY70. WRKY70 通过激活水杨酸(SA) 调控的 *NPR1* 下游基因表达, 抑制茉莉酸(JA)响应基因的表达来调控SA和JA的信号途径[22]. 烟草中的NtWRKY3和NtWRKY4是与抗病和水杨酸诱导相关的转录因子[23], 鉴于GmWRKY57B可以结合NPR1 启动子区的 Wbox, 推测 GmWRKY57B 在NPR1 的调控中可能具有一定的作用, 其是否与抗病和水杨酸诱导相关还有待于进一步研究.

许多 WRKY 基因自身的启动子区都含有 W-box 元件, 所以 WRKY 蛋白自身调控或交叉调控是 WRKY 家族中很普遍的特征. 比如, 拟南芥中的 WRKY 家族第II组成员 WRKY6 不但负调控其自身的表达, 而且还能调控和其亲缘关系较近的 WRKY42 的表达[12]; 然而WRKY家族第III组成员 WRKY54 却以一种复杂的模式影响第III组其他成员在不同病原菌处理或病原菌相关处理下的表达[24]. 另外, 还存在有亲缘关系较远的 WRKY 基因间的交叉调控: 第II组成员 WRKY11 和 WRKY17 对第III组成员 WRKY54 和 WRKY70 有负调控作用, 并且精细调控植物的防御反应系统[25], 说明植物体内WRKY转录因子间形成了一个高度关联的网络对 WRKY 基因进行调控. 转 *GmWRKY57B* 基因后虽然提高了烟草植株的抗旱性, 但其具体的作用机制及其在 WRKY 家族这个网络系统中的作用等还有待于进一步研究.

参考文献

1 Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 199—206[doi]

2 Zhang Y J, Wang L J. The WRKY transcription. factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants. BMC Evol Biol,

2005, 5(1): 1—12[doi]
3 Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5′ upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. Mol Gen Genet, 1994, 244(6): 563—571
4 Rushton P J, Macdonald H, Huttly A K, et al. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved *cis*-element in the promoters of alpha-Amyl genes. Plant Mol Biol, 1995, 29(4): 691—702[doi]
5 Rushton P J, Tones J T, Parniske M, et al. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. EMBO J, 1996, 15(20): 5690—5700
6 AbuQamar S, Chen X, Dahwan R, et al. Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. Plant J, 2006, 48(1): 28—44[doi]
7 Meier I, Hahlbrock K, Somssich I E. Elicitor-inducible and constitutive *in vivo* DNA footprints indicate novel *cis*-acting elements in the promoter of a parsley gene encoding pathogenesis-related protein 1. Plant Cell, 1991, 3(3): 309—315[doi]
8 Raventos D, Jensen A B, Rask M B, et al. A 20 bp *cis*-acting element is both necessary and sufficient to mediate elicitor response of a maize PRms gene. Plant J, 1995, 7(1): 147—155[doi]
9 Du L, Chen Z. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. Plant J, 2000, 24(6): 837—847[doi]
10 Yu D Q, Chen C H, Chen Z X. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. Plant Cell, 2001, 13(7): 1527—1539[doi]
11 Maleck K, Levine A, Eulgem T, et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. Nat Genet, 2000, 26(4): 403—410
12 Robatzek S, Somssich I E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. Genes Dev, 2002, 16(11): 1139—1149[doi]
13 Cao H, Bowling S A, Gordon A S, et al. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of sustemic acquired resistance. Plant Cell, 1994, 6(11): 1583—1592[doi]
14 Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, et al. The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell, 1997, 88(1): 57—63[doi]
15 Cao H, Li X, Dong X N. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(11): 6531—6536[doi]
16 王磊, 赵军, 范云六. 玉米 Cat1 基因顺式元件 ABRE2 结合蛋白 ABP9 的基因克隆及功能分析. 科学通报, 2002, 47(15): 1167—1171
17 Gietz R D, Schiestl R H. Transforming yeast with DNA. Methods Mol Cell Biol , 1995, 5(5): 255—269
18 Wang L, Luo Y Z, Zhang L, et al. Isolation and characterization of a C-repeat binding transcription factor from maize (*Zea mays* L.). J Integra Plant Biol, 2008, 50(8): 966—975
19 Curtis I S, Davey M R, Power J B. Leaf disc and transformation. Methods Mol Biol, 1995, 44: 59—70
20 Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, et al. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Biotechnol J, 2008, 6(5): 486—503[doi]
21 王海华, 郝中娜, 谢科, 等. 水稻 WRKY89 中的亮氨酸拉链结构增强蛋白与 W 盒元件的相互作用. 科学通报, 2005, 50(10): 970—978
22 Li J, Brader G, Palva E T. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate- mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. Plant Cell, 2004, 16(2): 319—331[doi]
23 Chen C, Chen Z. Isolation and characterization of two pathogen and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. Plant Mol Biol, 2000, 42(2): 387—396[doi]
24 Kalde M, Barth M, Somssich I E, et al. Members of the Arabidopsis WRKY group Ⅲ transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. Mol Plant Microbe Interact, 2003, 16(4): 295—305[doi]
25 Journot-Catalino N, Somssich I E, Roby D, et al. The transcription factors WRKY11 and WRKY17 as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2006,18(11): 3289—3302[doi]